

(51)Int.Cl.⁵

C 0 2 F 1/00

識別記号

Z A B P

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 9/52

9359－4B

【公開番号】

// (C 1 2 N 9/52

C 1 2 R 1:38)

(C 1 2 N 9/52

特開平 6－2 6 2 1 6 5

審査請求 未請求 請求項の数20 F D （全 16 頁） 最終頁に続く

| | | | | |
|--------------------------|-----------------|-----------------|---------|---|
| 【公開日】 | (21)出願番号 | 特願平5-260425 | (71)出願人 | 590000776 ダブリュ・アール・グレイス・アンド・カンパニー・コネティカット アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10036、 ニュー・ヨーク、アベニュー・オブ・ザ・ アメリカズ・1114 |
| | (22)出願日 | 平成5年(1993)9月27日 | (72)発明者 | アイリーン・イートマン・アルドリツジ アメリカ合衆国メリーランド州20723ローレル・ハモンドドライブ10910 |
| | (31)優先権主張番号 | 951974 | (72)発明者 | アラン・ブルース・チマーニイ アメリカ合衆国メリーランド州21701フレデリック・ホワイトオークドライブ6211 |
| | 平成6年(1994)9月20日 | 1992年9月28日 | (74)代理人 | 弁理士 小田島 平吉 |
| 【発明の名称】 | (32)優先権主張日 | | | |
| | (33)優先権主張国 | 米国(US) | | |
| バイオフィルムを抑制および除去するプロテアーゼ類 | | | | |
| 最終頁に続く | | | | |

(54)【発明の名称】 バイオフィルムを抑制および除去するプロテアーゼ類

【国際特許分類第5版】

(57)【要約】

【目的】 バイオフィルムを抑制および除去する方法を

C02F 1/00提供する。

【構成】 任意に他の特定の酵素類および／または界面

C12N 9/52活性剤と組み合わせて、本質的にプロテアーゼ類から成

る酵素組成物を、バイオフィルムを抑制もしくは除去す

//(C12N 9/52るに有効量でこの系に添加することからなる、水系に接

触する表面からバイオフィルムを抑制または除去する方

C12R 1:38法。

(C12N 9/52

C12R 1:20)

(C12N 9/52

C12R 1:185)

(C12N 9/52

C12R 1:07)

【審査請求】 未請求

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バイオフィーム堆積物を抑制または除去するに有効な用量で、本質的にプロテアーゼから成る酵素組成物をこの系に添加することを特徴とする、水系と接触する表面上のバイオフィーム堆積物を抑制または除去する方法。

【請求項2】 該プロテアーゼが、セリンプロテアーゼ類、メタロプロテアーゼ類、システインプロテアーゼ類、アスパラギン酸プロテアーゼ類、およびそれらの混合物から成る群より選択される請求項1記載の方法。

【請求項3】 該プロテアーゼが、エスペラーゼ、アルカラーゼ、スブチリシン、マキサターゼ、マキサカルおよびトリプシンから成る群より選択されるセリンプロテアーゼである請求項2記載の方法。

【請求項4】 該プロテアーゼがエスペラーゼである請求項3記載の方法。

【請求項5】 該プロテアーゼがアルカラーゼである請求項3記載の方法。

【請求項6】 該プロテアーゼが、ビブリオリシン、サーモリシン、サーモアーゼ、ノボT S、ニュートラーゼ、SP-369、プロテアーゼ2A、シーブローゼ5、プロチーム6、およびそれらの混合物から成る群より選択される請求項2記載の方法。

【請求項7】 該プロテアーゼがビブリオリシンである請求項6記載の方法。

【請求項8】 該プロテアーゼ用量が0.0001 u/mLないし100 u/mLの範囲である請求項1記載の方法。

【請求項9】 該プロテアーゼ用量が0.0005 u/mLないし1 u/mLの範囲である請求項1記載の方法。

【請求項10】 殺生物剤、界面活性剤、腐食抑制剤、スケール抑制剤、分散剤、キレート剤、ポリマー剤、ホスフェート類、ポリホスフェート類、シリケート類、緩衝剤、カルボキシレート類、スルホネート類および光学光沢剤から成る群より選択される1種以上の水処理剤と組み合わせて該酵素組成物を該水系に添加する請求項1記載の方法。

【請求項11】 該酵素組成物が更に界面活性剤を含んでいる請求項1記載の方法。

【請求項12】 該プロテアーゼ：界面活性剤の比率が、それぞれプロテアーゼ活性単位：界面活性剤重量を基準として0.0001：1ないし100：1の範囲である請求項11記載の方法。

【請求項13】 該プロテアーゼ：界面活性剤の比率が、それぞれプロテアーゼ活性単位：界面活性剤重量を基準として0.005：1ないし10：1の範囲である請求項11記載の方法。

【請求項14】 それぞれプロテアーゼ活性単位：界面活性剤重量の比率が0.001：1から100：1の範

囲でプロテアーゼと界面活性剤を含んでいる、水系に接触する表面上のバイオフィーム堆積物を抑制または除去するための組成物。

【請求項15】 1)本質的にプロテアーゼ類から成る酵素組成物を水系に添加し、2)この酵素組成物を該水系に循環させることにより、該酵素組成物とバイオフィーム堆積物とを接触させ、そして3)この水系に少なくとも1種のリパーゼ、カルボヒドラーゼまたはそれらの混合物を添加する、逐次的段階を含み、そしてここで、該酵素組成物と該リパーゼ、カルボヒドラーゼまたはそれらの混合物を、該バイオフィーム堆積物を抑制または除去するに充分な量で添加する、水系に接触する表面からバイオフィーム堆積物を抑制または除去する方法。

【請求項16】 殺生物剤、界面活性剤、腐食抑制剤、スケール抑制剤、分散剤、キレート剤、ポリマー剤、ホスフェート類、ポリホスフェート類、シリケート類、緩衝剤、カルボキシレート類、スルホネート類および光学光沢剤から成る群より選択される1種以上の水処理剤と組み合わせて該酵素組成物を該水系に添加する請求項15記載の方法。

【請求項17】 該プロテアーゼ用量が0.0001 u/mLないし100 u/mLの範囲である請求項15記載の方法。

【請求項18】 該プロテアーゼ用量が0.0005 u/mLないし1 u/mLの範囲である請求項15記載の方法。

【請求項19】 該リパーゼ、カルボヒドラーゼまたはそれらの混合物の用量が0.0001 u/mLないし100 u/mLの範囲である請求項15記載の方法。

【請求項20】 該リパーゼ、カルボヒドラーゼまたはそれらの混合物の用量が0.0005 u/mLないし1 u/mLの範囲である請求項15記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】本発明は、水系に接触する表面からバイオフィーム(biofilm)を抑制および/または除去する方法に関するものであり、より詳細には、バイオフィームを抑制および/または除去する目的で水系にプロテアーゼ類を用いることに関する。

【0002】

【発明の背景】冷却水系、特に開放循環系は、微生物形態(以後バイオフィームと呼ぶ)の増殖に好適な環境を与えている。水系の表面にバイオフィームが堆積すると、熱伝達表面の効率が低下し、管が詰まり、そしてこの系内の腐食がもたらされ得る。汚染された表面上のバイオフィーム堆積物が有する組成は、一般に、主として細菌から成っている。バイオフィームの中で見いだされる細菌属の中で多いものはグラム陰性種、特にシュードモナス(Pseudomonas)、アシネトバクター(Acinetobacter)およびアエロバクター(Aerobacter)である。バ

イオフィームの中に見いだされる他の属には、フラボバクテリウム (*Flabovacterium*)、デスルホビブリオ (*Desulfovibrio*)、エシェリキア (*Escherichia*) が含まれ、そして少数であるがバチルス (*Bacillus*) およびサルシナ (*Sarcina*) の如きグラム陽性属もいくつか含まれる。

【0003】グラム陰性細菌が有する細胞壁構造がバイオフィーム生成の原因となる重要な因子である。この細胞壁は、アセチルアミノ糖類とアミノ酸で出来ているペプチドグリカンから成っており、そして外側膜は、蛋白質、リボ多糖類およびリボ蛋白質で構成されている。それとは対照的に、グラム陽性細菌が有する細胞壁構造は主にペプチドグリカンとテイコイル酸で出来ている。

【0004】微生物もまた広範なスライム層もしくはカプセルを生じが、これらの組成は異なっている。極めて少ない例を除き、細菌が生じるスライムの全ては、ある形態の多糖類、例えばデキストラン類、グルカン類またはポリウロニド類である。単一の細菌が生じるスライムの体積は、単一の細菌が有する体積の数倍に及ぶ可能性がある。Costerton他は、このスライム層を「グリコカリックス (*glycocalyx*)」と名付けた、と言うのは、この組成は、炭水化物が豊富な特定の動物細胞に類似しているからである。このグリコカリックスは、バイオフィームの中で観察されるほとんど全ての細菌から生じ、そしてこれは、表面への付着にとって重要ないくつかの機構を与えている。1番目として、このグリコカリックスは、その表面と細菌の間に緩衝領域を与え、これが、静電的反発（これが接触を防止している）を低下させ、そして2番目として、このグリコカリックス内のポリマーが、表面基質への物理的および／または静電的結合を生じ得る。実験的証拠を基にして、表面に天然のバイオフィームが発達することは、細菌属の相続を伴い、これがそのバイオフィームの中の異なる層を形成している。このバイオフィームのマトリックスは雑多な組成を有するものであり得るが、これは主に多糖類で出来ている。このことによって、可能なバイオフィーム除去を目的とする研究努力が、ポリサッカリダーゼ類（カルボヒドラーゼ類）およびリパーゼ類（リボ多糖類およびリボ蛋白質成分のための）の評価に向けられた。

【0005】浄化用のプロテアーゼ含有組成物は本分野でよく知られている。上記組成物は商業的に入手可能であり、多くの従来技術の中に記述されている。この文献の代表的なものは米国特許番号 RE 30,602; 3,553,139; 3,674,643; 3,697,451; 3,748,233; 3,790,482; 3,827,938; 3,871,963; 3,931,034; 4,162,987; 4,169,817; 4,287,101; 4,429,044; 4,480,037; 4,511,490; 4,515,705および4,543,333、並びにE. H. HouwinkおよびR. R. Van der Meer編集「バイオテクノロジーの改革」(*Innovations in Biotechnology*)、31から52頁 (Elsevier Science Publishers Amsterdam 1984) である。

【0006】浄化用組成物で最も幅広く用いられているプロテアーゼは、種々のバチルス菌株由来のアルカリ性プロテアーゼ類である。上記プロテアーゼ類（これらは、Novo Nordisk Bioindustrials Inc. Danbury Conn. から EsperaseTM および AlcalaseTM の如き商標で市販されておりそして Gist-Brocades Charlotte N.C. から MaxataseTM および MaxacalTM の如き商標で市販されている）は、所望のアルカリ安定特性と蛋白分解活性を有している。

【0007】米国特許番号4,865,983には、ビブリオ・プロテオリチクス (*Vibrio proteolyticus*) (ATCC 53559) 産生プロテアーゼ（以後「ビブリオリシン (*vibrio lysin*)」と呼ぶ）を浄化用組成物の中で用いることが開示されている。他の数多くの種々のプロテアーゼ類およびそれらの個々の有効性もまた、Cowan他、*Trends in Biotechnology*、第3巻 No. 3 68-72頁 (1985) の中に記述されている。

【0008】

【発明の要約】本発明の1つの目的は、水系と接触する表面からバイオフィームを抑制および／または除去する、無害で生態学的に安全な方法を提供することにある。

【0009】本発明の別の目的は、水系と接触する表面上へのバイオフィーム蓄積防止で用いるための、プロテアーゼ類と界面活性剤との組み合わせを含んでいる新規な組成物を提供することにある。

【0010】本発明の別の目的は、腐食抑制剤、スケール抑制剤、殺生物剤、分散剤などの如き他の通常の水処理剤に適合性を示すと共にそれらとの組み合わせで用いるに有効な組成物を用いた、冷却タワーシステムの如き産業用水系中の表面からバイオフィームを除去する方法を提供することにある。

【0011】本発明に従い、バイオフィームの堆積を抑制または除去するに有効な用量で、本質的にプロテアーゼ類から成る酵素系をこの系に添加することを含む、水系に接触する表面からバイオフィームを抑制および／または除去する方法を提供した。

【0012】本発明に従いまた、プロテアーゼ類と界面活性剤との組み合わせを含んでいる、水系に接触する表面からのバイオフィーム抑制または除去で用いるための組成物を提供する。

【0013】本発明に従いまた、1) 本質的にプロテアーゼ類から成る酵素組成物を水系に添加し、2) この酵素組成物を該水系に循環させることにより、該酵素組成物とバイオフィーム堆積物とを接触させ、そして3) この水系に少なくとも1種のリパーゼ、カルボヒドラーゼまたはそれらの混合物を添加する、逐次的段階を含み、そしてここで、該酵素組成物と該リパーゼ、カルボヒドラーゼまたはそれらの混合物を、該バイオフィーム堆積物を抑制または除去するに十分な量で添加する、水系に

接触する表面からバイオフィーム堆積物を抑制または除去するための、増強された方法を提供する。

【0014】

【詳細な記述】本発明は、水系に接触する表面からバイオフィームを抑制または除去するための新規な特定方法および組成物を意図したものである。ここで用いる言葉「バイオフィームの抑制または除去」は、該バイオフィームの接着を抑制することを表すものであり、この水系の中に存在している微生物有機体を活性的に死滅させる殺微生物活性を表すものではない。この方法は、水系に接触する表面からバイオフィームを抑制または除去するに有効な量で、本質的にプロテアーゼ類から成る酵素組成物を水系に添加することを含んでいる。これらの酵素組成物は、任意に、追加的バイオフィーム除去を与える種々の界面活性剤を含んでもよい。本発明の酵素組成物はまた、バイオフィームの抑制または除去を更に増強させる有効量で、以下に定義する如き他の特定酵素との組み合わせで用いられてもよい。本発明の方法および酵素組成物は、本質的に、その主要な活性を示す処理成分としてのプロテアーゼ類から成っている。即ち、プロテアーゼ類単独で有効なバイオフィーム堆積抑制が得られ、従ってバイオフィーム抑制は、セルラーゼまたはアミラーゼの如き他の酵素の存在を必要としないことを見出した。このような他の酵素類は、今まで、バイオフィーム抑制に必要であると信じられていた。従って、本発明に従う方法および酵素組成物は本質的にプロテアーゼ類から成っており、実質的に、セルラーゼ、アミラーゼの如き他の酵素類を含有していない。

【0015】本発明のプロテアーゼ組成物が示す、水系中のバイオフィームを抑制する有効性は、驚くべきことであると共に予想外であった、何故ならば、バイオフィームの接着は、プロテアーゼ類の影響を受けない多糖類構成要素によるものであると信じられていたからである。

【0016】本発明で用いるに適切なプロテアーゼ類は、これに限定されるものではないが、セリンプロテアーゼ類、例えばエスペラーゼ (Esperaase) (Novo)、アルカラーゼ (Alcalase) (Novo)、スブチリシン (Sigma)、マキサターゼ (Maxatase) (Gist-Brocade)、マキサカル (Maxacal) (Gist-Brocade)、トリプシン (Sigma) など、メタロプロテアーゼ類 (metalloproteases)、例えばビブリオリシン (vibriolysin) (W.R. Grace)、サーモリシン (Sigma)、サーモアーゼ (Thermoase) (Daiwa Kasei KK)、ノボTS (Novo TS) (Novo)、ニュートラーゼ (Neutrased) (Novo)、SP-369 (Novo)、プロテアーゼ2A (Amano)、シープローゼS (Seaprose S) (Amano)、プロチーム6 (Prozyme 6) (Amano) など、システインプロテアーゼ類、例えばパパイン、アスパラギン酸プロテアーゼなど、並びにそれらの混合物、例えばセリンとメタロプロテアー

ゼ類の混合物（これは、商標PronaseTMの下でSigmaから商業的に入手可能である）などが含まれる。

【0017】プロテアーゼ類は、粉末、顆粒、スラリーおよび液体を含むいくつかの形態で商業的に入手可能である。本発明は主に水系の処理を意図したものであることから、スラリーもしくは液体形態のプロテアーゼが好適であるが、しかしながら一般に、如何なるプロテアーゼも本発明で用いるに適切である。本発明の方法および組成物に対する特別な利点は、他の水処理組成物、例えば酸化剤、殺生物剤、スケール抑制剤、腐食抑制剤、光学光沢剤、ホスフェート類、ホスホネート類、ポリホスフェート類、シリケート類、緩衝剤、界面活性剤、カルボキシレート類、スルホネート類などの存在下の水系中でプロテアーゼ類が安定性を示すことである。

【0018】本分野の技術者によく知られているように、特定のプロテアーゼ類は、特定のpHおよび温度条件下で、増強された活性と上昇した安定性を示す。従って、本発明の方法に従う最適な結果を得るための重要な考慮は、処理すべき特別な水系が示す特別なpHおよび温度条件下で高い活性と良好な安定性の両方を示す、適当なプロテアーゼを選択することである。これに関して、米国特許番号4,865,983（これはその全体がここでは参照にいれられる）に開示されている如きビブリオリチン (ATCC 53559) が分泌するプロテアーゼであるビブリオリシンは、幅広いpHおよび温度範囲に渡って安定性を示すことから、幅広い範囲の水系の処理で用いるに特に適切であることが見いだされた。加うるに、ビブリオリシンは、クロリンの如き酸化剤の存在下で優れた安定性を示す。ビブリオリシン、アルカラーゼおよびエスペラーゼはまた、これに限定されるものではないが、殺生物剤、スケール抑制剤、腐食抑制剤、光学光沢剤、ホスフェート類、ホスホネート類、ポリホスフェート類、シリケート類、緩衝剤、界面活性剤、カルボキシレート類、スルホネート類などを含む他の通常に用いられている水処理剤の存在下で特に安定性を示す。従って、本発明の好適な具体例は、ビブリオリシン、アルカラーゼおよびエスペラーゼから成る群から選択されるプロテアーゼのバイオフィーム抑制量をこの系に添加することを含む、水系に接触する表面からバイオフィームを抑制または除去する方法を意図したものである。

【0019】本発明のバイオフィーム抑制および除去に対して有利に処理され得る水系には、これに限定されるものではないが、冷却水系、例えば冷却タワー、脱塩装置、パルプおよび紙製造系、ガスクラバー類、並びにバイオフィーム堆積が生じることが知られている他の循環水系が含まれる。本発明は、60度Fから200度Fの温度で運転される冷却水系、特に約80度Fから150度Fの温度で運転される開放循環冷却水系の処理で特に有効である。

【0020】本発明の酵素組成物は、該バイオフィーム

を抑制または除去するに有効な量で該水系に添加される。正確な用量は本質的に本発明にとって決定的でなく、ある程度、処理すべき水系の性質および所望保護度合に応じて幅広く変化し得る。しかしながら一般に、この水系に添加されるプロテアーゼ濃度は、 0.0001 U/mL から 100 U/mL であってもよく、ここで、 U は、実施例4により詳しく記述する如き活性単位である。この用量範囲内において、一般に低用量の 0.0005 から 1 U/mL が好適である。勿論、バイオフィーム堆積物が過剰な系に、より高い用量を添加することも可能である。しかしながら、純粋に経済的理由で、一般的には、このような用量を推奨しない。

【0021】産業用水系における本発明の一般的実施では、最初に、存在しているバイオフィーム堆積物を抑制および／または除去する目的でより高い「開始」用量を添加するのが好適である。次に、この開始用量に続いて、最小限の抑制レベルを維持するに充分な量であるより低い「制御」用量を用いる。勿論、この開始用量は、処理すべき水系の性質およびこの系の中に存在しているバイオフィーム堆積物の度合に応じて幅広く変化し得る。この開始用量は、好適には 0.1 U/mL から 100 U/mL の範囲である。該制御用量は、好適には 0.001 U/mL から 1 U/mL の範囲である。特別な水系に関して必要とされる正確な用量は、通常様式で本分野の通常の技術者によって容易に決定され得る。

【0022】別の好適な具体例において、本発明の方法は、本質的にプロテアーゼ類から成る酵素組成物を1種以上の界面活性剤と組み合わせる該水系に添加することを含んでいる。界面活性剤とプロテアーゼ類の両方がバイオフィーム抑制および除去特性を示すことから、この特別な組み合わせが増強されたバイオフィーム抑制および除去効果を示すことが見いだされた。従って、本発明のこの面に従って、プロテアーゼと界面活性剤との組み合わせを含んでいる、水系に接触する表面からのバイオフィーム抑制および／または除去を増強する新規な組成物を提供した。この組成物中のこれらの成分の相対的比率は、本発明にとって本質的に決定的であるとは見なされないが、勿論、この処理される系内のその組み合わせられた用量が該バイオフィーム堆積物を抑制もしくは除去するに有効であることを条件とする。一般に、この界面活性剤は、重量／体積を基準にして 0.001% から 1% の用量範囲でその系に添加される。従って、この用量は、それぞれ $0.0001:1$ から $100:1$ 、好適にはそれぞれ $0.005:1$ から $10:1$ の(プロテアーゼ活性単位):(界面活性剤重量)比率を有する酵素-界面活性剤組成物に相当している。これらの酵素および界面活性剤は、該水系に独立して添加されるか、或は有利に、上記比率を有する前混合された組成物として添加されてもよい。

【0023】本発明で用いるに適切な界面活性剤には、

カチオン系、非イオン系、アニオン系、両性および双性界面活性剤が含まれる。非発泡性界面活性剤を用いるか或は発泡性界面活性剤を低濃度で用いるのが一般に好適である。制限することのない説明の目的で、適切なアニオン系界面活性剤には、アルキルベンゼンスルホネート類、アルキルスルフェート類、アルキルポリエトキシエーテルスルフェート類、パラフィンスルホネート類、アルファ-オレフィンスルホネート類、アルファ-スルホカルボキシレートおよびそれらのエステル類、アルキルグリセリルエーテルスルホネート類、脂肪酸モノグリセライド類のスルフェート類およびスルホネート類、アルキルフェノールポリエトキシエーテルスルフェート類、2-アシルオキシアルカン-1-スルホネート類、およびベター-アルキルオキシアルカンスルホネート類などの水溶性塩類が含まれる。適切な非イオン系界面活性剤には、水溶性エトキシレート材料、例えば第一および第二エトキシレート類およびアルキルフェノールエトキシレート類が含まれる。

【0024】本発明の更に別の具体例において、上記プロテアーゼ酵素組成物を該水系に添加した後、続いてリパーゼ類、カルボヒドラーゼ類またはそれらの混合物を添加することによって、バイオフィーム除去が更に増強され得る。本発明のこの具体例に従い、1)本質的にプロテアーゼ類から成る酵素組成物を任意に界面活性剤との組み合わせで水系に添加し、2)この酵素組成物を循環させることにより、該酵素組成物とバイオフィーム堆積物とを接触させ、そして3)この水系に少なくとも1種のリパーゼまたはカルボヒドラーゼまたはそれらの混合物を添加する、逐次的段階を含み、そしてここで、該酵素組成物と該リパーゼおよび／またはカルボヒドラーゼを、該バイオフィーム堆積物を抑制または除去するに充分な量で添加する、水系に接触する表面からバイオフィーム堆積物を抑制および／または除去する方法をここに提供した。このリパーゼ、カルボヒドラーゼまたはそれらの混合物の用量は、前に示したプロテアーゼ用量に相当している。

【0025】適切なリパーゼ類には、リボラーゼ(Lipase)(Novo)、リパーゼ(Lipase)P-30(Amano)、リパーゼ MAP-10(Amano)、リパーゼ N(Amano)、リパーゼ AP12(Amano)、ブタすい臓リパーゼ(Sigma)、カンジダ(Candida)リパーゼ(Sigma)、シュドモナス(Pseudomonas)リパーゼ(Amano)、リゾプス(Rhizopus)リパーゼ(Amano)、ムコル(Mucor)リパーゼ(Amano)、アスペルギラス(Aspergillus)リパーゼ(Amano)などが含まれる。

【0026】適切なカルボヒドラーゼ類には、BAN 120L(Novo)、ビスコチーム(Viscozyme)120L(Novo)、ターマミル(Termamyl)120L(Novo)、セレフロ(Cerflo)200L(Novo)、グルカナーゼ(Glucanase)(Sigma)、 β -グルクロニダーゼ(β -Glucuronidase)(Sig

ma)、マキサミル(Maxamyl)(Gist-Brocade)、セルラーゼ(Cellulase)(Sigma)、デキストラナーゼ(Dextranase)(Amano)、ペクチナーゼ(Pectinase)P-II(Amano)、セルラーゼTAP(Amano)および;シトファガ・グルコナーゼ(Cytophaga Gluconase)(Sigma)などが含まれる。

【0027】前に示した詳述を用いることで、本分野の通常の技術は、更に一層の努力を行うことなく本発明を最大度まで利用することができるものと考えられる。

【0028】以下に示す実施例は、本発明の原理に従って本発明を説明する目的で与えるものであり、添付請求の範囲に示すものを除き、如何なる様式でも本発明を制限するものと解釈されるべきではない。全ての部およびパーセントは、特に明記されていない限り重量である。

【0029】

【実施例】

実施例1

バイオフィルムの調製

種々の冷却タワー環境から単離した~200種の微生物から選択した、16種の代表的なバイオフィルム産生微生物の共同体を用いて、バイオフィルムを生じさせた。この共同体は、シュードモナス、アシネトバクター、セラチア(Serratia)、好熱生物、並びに腸内細菌科1員のいくつかを含む、異なる属からの有機体を含んでいた。これらの菌株を、-70℃の冷凍状態で純粋な培養物として維持した。

【0030】バイオフィルム生成を樹立する目的で用いた試験表面は、ステンレス鋼製の発生容器の中に入っている40メッシュの316ステンレス鋼製ワイヤーメッシュスクリーンのクーポン(coupons)のラックであった。

【0031】このバイオフィルム発生装置の中で用いた増殖用培地は、4.7mMのMgSO₄、23.4mMのNaCl、11.5mMのNa₂SO₄、4.4mMのNaHCO₃、2.5mMのCaCl₂、2.6mMのCaSO₄・H₂Oおよび0.3mMのNa₂SiO₃・9H₂Oが入っている合成冷却タワー水(SCTW)から成っていた。SCTWに、グリセロールを2.25g/LそしてTrypticase SoyBroth(TSB)固体を0.45g/L補った。バイオフィルム発生装置を攪拌し、空気中でスパージした後、バイオフィルムが増殖している間、30℃に維持すると共に、酸または塩基を添加することによりpHを7.2-7.8に維持した。このステンレ

ス鋼製クーポンの上にバイオフィルムが生じるには7日から10日間が必要であった。

【0032】実施例2

クーポンの酵素処理

汚染されたクーポンを、その発生装置のラックから取り出した後、綺麗なSCTWの中で短期間濯ぐことにより、プランクトン性細菌を除去した。各々の処理群に関するクーポンを、薄いプラスチック片で、皿の底の上に支持されている2つの空の四角いペトリ皿の中に入れた。各々の皿にプロテアーゼか或はプロテアーゼと界面活性剤の溶液を加えることで、そのクーポンを若干覆った。これらの皿をジャイロータリー(gyrotary)振とう機の上に置き、穏やかな攪拌(65rpm)で24時間40℃に保温した。該試験溶液と一緒に保温した後、各々のクーポンを綺麗なSCTWで濯ぐことにより、接着していないバイオフィルムを除去した。

【0033】バイオフィルム予防実験では、該細菌共同体を接種した後のバイオフィルム発生装置に直接、プロテアーゼか或はプロテアーゼと界面活性剤を添加した。プロテアーゼを添加しなかった対照のバイオフィルム発生装置を、その処理した発生装置と同じ時間に開始させた。実施例4に記述する2つのアッセイの1つを用いて、この液体のプロテアーゼ活性を定期的に監視した。最初のプロテアーゼ活性レベルを維持する目的で、必要に応じて追加的に酵素を添加した。7日から10日後、発生装置からクーポンを取り出し、そして接着したバイオマスを測定するに先立って、綺麗なSCTWで濯いだ。

【0034】実施例3

接着したバイオマスの測定

実験が終了した時点で、該ステンレス鋼製クーポンとそれらに接着しているバイオマスを綺麗なSCTWの中で濯いだ後、空気乾燥した。熱水可溶化段階を用いて、その乾燥したバイオマスを取り出した。次に、Pierceから商業的に入手可能なBCA蛋白質アッセイ試験キットを用いて、各々のクーポンから得られる溶液を、クーポン当たりの全蛋白質レベルに関して分析した。クーポンの蛋白質レベルと、クーポン上の全バイオマスに関する実際の乾燥重量測定との間の比較を基にして、上記アッセイはバイオフィルムレベルに関する満足される尺度であることが確認された(表1参照)。

【0035】

【表1】

表1

全蛋白質を用いて測定したバイオフィルム除去と、酵素処理後に測定したバイオフィルムの直接的乾燥重量測定との比較

| 処理 | 除去された蛋白質% | 除去された乾燥重量% |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| 0.05%のネオドール25-7 | 16 ⁽¹⁾ | 11 ⁽¹⁾ |
| 1.0U/mLのエスペラーゼ+ | | |
| 0.05%のネオドール25-7 | 69 | 64 |

| | | |
|---------------------|----|----|
| 0.1 U/mLのエスペラーゼ+ | | |
| 0.05%のネオドール25-7 | 30 | 26 |
| 0.01 U/mLのエスペラーゼ+ | | |
| 0.05%のネオドール25-7 | 25 | 14 |
| 0.001 U/mLのエスペラーゼ+ | | |
| 0.05%のネオドール25-7 | 30 | 17 |
| 0.0001 U/mLのエスペラーゼ+ | | |
| 0.5%のネオドール25-7 | 13 | 14 |

(1) バイオフィーム除去が統計学的に有意であるためには、蛋白質/乾燥重量除去は $>12\%$ (0.4 g) である必要があった。

【0036】実施例4

酵素活性の測定

バイオフィームの除去もしくは防止実験で用いる酵素の効率を評価しそして処理培養期間中の酵素が示す活性の測定を行う、各々の実験に関する酵素活性を標準化する目的で、下記の2つのアッセイを用いてプロテアーゼ活性を監視した。

A. アゾカゼイン (Azocasein) 加水分解

アゾカゼイン (スルファニルアミド-アゾカゼイン、Sigma Corp. St. Louis MO) が1.0 mg/mL入っている50 mMのトリス-HCl緩衝液 (pH 7.4) 中、37°Cで10分間、プロテアーゼのサンプルを最終体積が0.5 mLになるように培養する。この培養期間の最後に、10% w/vのトリクロロ酢酸を0.5 mL加えた後直ちに混合し、そしてその後、この得られる混合物を氷上に10分間保存した。次に、この混合物を遠心分離し、そして得られる上澄み液の光学密度を、420 nmで、緩衝させたアゾカゼイン溶液の中に全く酵素が入っていないか或は不活性化した酵素が入っているブランクに対して測定した。420 nmで2.5の吸収変化を生じさせるに必要な酵素量として1活性単位を定義する。

【0037】B. セリンプロテアーゼ類に関するペプチダーゼアッセイ

このアッセイは、DelMar, E.G.他 Anal. Biochem. 99:316 (1979) の中に記述されている如き、スクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリル-L-フェニルアラニル-p-ニトロアニリド (sAAPFPN) からp-ニトロアニリンが放出されることによる、410 nmにおける吸収の増大を測定するものである。これらの反応混合物は、50 mMのトリス緩衝液 (pH 8.5) 中1 mMのsAAPFPNを含んでおり、そして最終体積である1.0 mLの中に適切な量のプロテアーゼを含んでいた。

【0038】実施例5

ビブリオリシンの調製

下記の組成 (1リットル当たりのgまたはmL) : NZ-アミンB、40 ; Na_2SO_4 、25 ; デキストロス、10 ; K_2HPO_4 、4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.

4 ; 消泡剤、1.0 mL ; および微量元素溶液6.1 mL ; を有する培地の中で、ビブリオ・プロテオリチクス (ATCC 53559) を培養した。この微量元素ストック溶液は下記を含んでいる (1リットル当たりのグラム) ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、18.29 ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、18.86 ; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.91 ; HBO_3 、0.07 ; および $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.04。殺菌に先立って、pHを7.0に調整した。

【0039】1.5リットルか或は10リットルの発酵装置の中でV. プロテオリチクスを培養した。上述した培地が入っている発酵装置に、同じ組成を有する培地が入っている振とうフラスコの中でV. プロテオリチクスを20時間増殖させることによって得られた培養物を1% (v/v) 接種した。この発酵を、28°C、1,000-1,250 rpm、および1分当たりの培地1体積当たり1.0体積の空気から成る通気で行った。酸または塩基滴定標準液を自動添加することにより、この発酵物のpHをpH 7.8に維持した。

【0040】640 nmの光学密度を測定することでV. プロテオリチクスの増殖を監視し、そして前に記述したアゾカゼインアッセイでプロテアーゼ活性を監視した。この発酵初期の安定増殖期の間に、この産生物であるプロテアーゼは、約85,200から127,800アゾカゼイン単位/リットルの滴定値に到達する。遠心分離して細胞部分を分離することにより、ブロスを収穫した。

【0041】蛋白分解活性を有する上澄み液を、螺旋に巻かれているフィルターAmicon S10Y10 (Amicon Corp. Lexington MA) を用いて濃縮した。この濃縮物を、このレンテンテート (rententate) が示す伝導度が約1 mSになりそしてpHが中性になるまで、1 mMの CaCl_2 が入っている10 mMのトリス緩衝液を用いたダイヤフィルトレーションにかけた。この材料を凍結乾燥した後、使用するまで-20°Cで保存した。

【0042】実施例6

エスペラーゼ8.0 Lによるバイオフィーム除去

実施例1で調製したのと同じ汚染されたクーポンを、SCTW (pH 8.5) 中のエスペラーゼ8.0 L溶液を用い、40°Cで24時間処理した。これらのクーポンが入っている皿を65 rpmで渦巻き回転させることにより、その汚染された表面の上で酵素溶液を穏やかに動かし続けた。ネオドール25-7 (非イオン系、Shell Chemi-

a1) の如き界面活性剤を添加することにより、酵素単独が示す効果よりもバイオフィーム除去が改良された。酵素活性をアゾカゼイン単位数/mLで表す。これらの結

果を表2に示す。

【0043】

【表2】

表2

| バイオフィーム除去に対して異なる濃度のエスペラーゼ8.0Lが示す効果 | | |
|------------------------------------|---------------------------|-----------|
| 処理 | 除去された蛋白質mg ⁽¹⁾ | 除去された蛋白質% |
| 0.05%のネオドール25-7 | 1.6 | 16 |
| 0.8U/mLのエスペラーゼ (熱で不活性化) | 0 | 0 |
| 0.8U/mLのエスペラーゼ ⁽²⁾ | 3.1 | 31 |
| 0.8U/mLのエスペラーゼ+ 0.05%のネオドール25-7 | 5.0 | 50 |
| 1.0U/mLのエスペラーゼ+ 0.05%のネオドール25-7 | 5.2 | 52 |
| 5.0U/mLのエスペラーゼ+ 0.05%のネオドール25-7 | 4.4 | 44 |

脚注

(1) バイオフィーム除去が統計学的に有意であるためには、蛋白質除去は ≥ 1.3 mgの蛋白質(13%の除去)である必要があった。

【0044】⁽²⁾ 1U/mLのエスペラーゼは、約70μgの酵素/mLに相当している。

【0045】実施例7

アルカラーゼ2.4Lによるバイオフィーム除去

実施例1で調製したのと同じ汚染されたクーポンを、SCTW(pH8.5)中のアルカラーゼ2.4L溶液(Novo Nordisk Bioindustrials, Inc.)を用い、40℃で24時間処理した。実施例6に記述した操作を繰り返し、そしてその結果を表3に示す。

【0046】

【表3】

表3

| 処理 | 除去された蛋白質mg ⁽¹⁾ | 除去された蛋白質% |
|--------------------------------|---------------------------|-----------|
| 0.05%のネオドール | 2.23 | 25.6 |
| 1.0U/mLのアルカラーゼ | 5.97 | 68.5 |
| 1.0U/mLのアルカラーゼ+ 0.05%のネオドール | 6.18 | 71.0 |

(1) バイオフィーム除去が統計学的に有意であるためには、蛋白質除去は ≥ 1.56 mgの蛋白質または $\geq 17.9\%$ である必要があった。

【0047】実施例8

ビブリオリシンによるバイオフィーム除去

実施例1に従って、汚染されたクーポンを調製した後、

SCTW(pH8.5)中のビブリオリシン溶液を用い、40℃で24時間処理した。実施例6に記述した操作を繰り返し、そしてその結果を表4に示す。

【0048】

【表4】

表4

| バイオフィーム除去に対して異なる濃度のビブリオリシンが示す効果 | | |
|---------------------------------|---------------------------|-----------|
| 処理 | 除去された蛋白質mg ⁽¹⁾ | 除去された蛋白質% |
| 0.05%のネオドール25-7 | 1.6 | 16 |
| 0.8U/mLのビブリオリシン+ | | |
| 0.05%のネオドール25-7 | 3.2 | 32 |
| 1.0U/mLのビブリオリシン+ | | |
| 0.05%のネオドール25-7 | 3.2 | 32 |
| 5.0U/mLのビブリオリシン+ | | |
| 0.05%のネオドール25-7 | 4.0 | 40 |

脚注

(1) バイオフィーム除去が統計学的に有意であるためには、蛋白質除去は ≥ 1.3 mgの蛋白質(13%の除去)である必要があった。

【0049】実施例9

バイオフィーム生成防止に対するエスペラーゼ+ネオドール処理の効果

バイオフィーム生成防止に対する酵素/界面活性剤処理

を評価する目的で実験を行った。2つの発生装置を組み立て、そして実施例1と同じ細菌共同体を接種した。1つの発生装置を1 U/mLのエスペラーゼと0.01%のネオドール25-7で処理する一方、対照の発生装置には全く補充しなかった。その処理した発生装置のプロテアーゼ濃度を一定に保つ目的で、定期的にエスペラーゼを添加した。バイオフィルムの生成を刺激する目的で、各々の発生装置に栄養素を定期的に添加した。10日経った後、各々の発生装置の中のクーボン上に残存しているバイオフィルムの量を乾燥重量と全蛋白質(BC

A方法)で測定した。2日、4日および8日目に、プランクトン性微生物集団の生菌数を数えた。表5および6に示すように、これらの結果は、この微生物集団は 10^8 個の生菌/mLの一定レベルに維持されたことを示している。従って、この処理は、明らかに、殺生物作用よりはむしろ、細胞がクーボンに接着するのを防止していることによるものである。

【0050】

【表5】

表5

| バイオフィルム生成防止に対する酵素/界面活性剤処理の効果 | | | | | |
|------------------------------|---------|----------------------------|----------------|----------------|------------|
| 実験 | 処理 | 乾燥重量 (クーボン当たり の平均mg) | バイオフィルム 減少% | 蛋白質 (mg/mL) | 蛋白質 減少% |
| 1 | なし | 3.6 | | 5.4 | |
| | エスペラーゼ+ | | | | |
| | ネオドール | 1.7 | 52.7 | 2.3 | 57.4 |
| 2 | なし | 3.3 | | 4.6 | |
| | エスペラーゼ+ | | | | |
| | ネオドール | 1.4 | 57.6 | 3.0 | 34.8 |

【0051】

【表6】

表6

処理(エスペラーゼ/ネオドール)および未処理バイオフィルム発生装置で得られるプランクトン性微生物集団の評価

| コロニーを生じる単位数($\times 10^8$)/mL (日数) | | | | |
|---|--------------|-----|-----|-----|
| 実験 | 処理 | (2) | (4) | (8) |
| 1 | なし | 6.5 | 6.1 | 8.3 |
| | エスペラーゼ+ネオドール | 6.9 | 7.0 | 2.7 |
| 2 | なし | 2.3 | 1.5 | 2.6 |
| | エスペラーゼ+ネオドール | 2.3 | 1.0 | 3.3 |

実施例10

バイオフィルム生成防止に対するアルカラーゼ+ネオドール処理の効果

2つの発生装置を組み立て、そして実施例1と同じ細菌共同体を接種した。1つの発生装置を1 U/mLのアルカラーゼ2.4 Lと0.01%のネオドール25-7で処理する一方、対照の発生装置には全く補充しなかつ

た。その処理した発生装置のプロテアーゼ濃度を一定に保つ目的で、定期的にアルカラーゼを添加した。実施例9と同様に栄養素を定期的に添加した。8日経った後、クーボン上に残存しているバイオフィルムを実施例9と同様に測定した。

【0052】

【表7】

表7

8日間に渡るワイヤーメッシュクーボン上へのバイオフィルム堆積防止に対するアルカラーゼ+ネオドールの効果

| 処理 | 微生物数 ¹ (CFU/mL $\times 10^8$) | 全蛋白質 (mg/クーボン) | 蛋白質減少 (%) | 乾燥重量 (mg) | バイオフィ ルム減少% |
|--------|--|-------------------|--------------|------------------|----------------|
| なし | 5.0 | 6.7 ² | | 8.5 ² | |
| アルカラーゼ | | | | | |
| +ネオドール | 5.7 | 2.7 | 59.7 | 2.0 | 76.5 |

¹ 発生装置のブロス1 mLあたりに生存している微生物のコロニー生成単位

² ランダムに選択した10個のクーボンに関する平均

値

実施例11

バイオフィルム生成防止に対するビブリオリシン+ネオ

ドール処理の効果

2つの発生装置を組み立て、そして実施例1と同じ細菌共同体を接種した。1つの発生装置を1 U/mLのビブリオリシンと0.01%のネオドール25-7で処理する一方、対照の発生装置には全く補充しなかった。その処理した発生装置のプロテアーゼ濃度を一定に保つ目的

で、定期的にビブリオリシンを添加した。実施例9と同様に栄養素を両方の発生装置に定期的に添加した。8日経った後、12個のクーポン上に残存しているバイオフィームを実施例9と同様に測定した。

【0053】

【表8】

表8

バイオフィーム生成防止に対するビブリオリシン+ネオドールの効果

処理 クーポン当たりの全蛋白質 (mg) 蛋白質減少 (%)

なし 8.27

ビブリオリシン+

ネオドール 2.99 63.8

¹ 12個のクーポンから得られた値の平均

この実施例で得られる残りの汚染されたクーポンが入っている2つのタワーを、新鮮なSCTWが入っている2つの発生装置に移した。次に、両方の発生装置にビブリオリシン (1 U/mL) とネオドール25-7 (0.01%) を加えた。1 mL当たり1 アゾカゼイン単位で、プロテアーゼ濃度を一定に維持する目的で、ビブリオリ

シンを定期的に添加した。実施例1と同様にして攪拌、通気、pHおよび温度を調節したが、追加的营养素または細菌接種材料は全く添加しなかった。2日経った後、ランダムに選択した12個のクーポン上に残存しているバイオフィームを実施例9と同様に測定した。

【0054】

【表9】

表9

ビブリオリシン+ネオドールを用いたバイオフィームのインサイチュー除去

初期蛋白質濃度 最終蛋白質濃度 除去%
(mg/クーポン)¹ (mg/クーポン)¹

実験1 2.99 1.61 46%

実験2 8.27 3.58 57%

¹ 12個のクーポンから得られた値の平均実施例12プロテアーゼおよびリパーゼの逐次的処理によるバイオフィーム除去

この実施例は、ひどく汚染されたクーポンに対する、プロテアーゼとリパーゼ酵素を逐次添加処理することの効果を示すものである。合成冷却タワー水 (SCTW) 中の未処理対照クーポン (~15 mgの蛋白質/クーポン)

ンおよび処理クーポンに対するバイオフィーム (蛋白質) 除去の間の差を用いて、処理効果を測定した。単一処理 (a) 当たりの全培養時間は24時間であり、一方逐次処理 (b) 培養は全体で48時間であった。これらの結果を表10に示す。

【0055】

【表10】

表10

処理 除去された蛋白質mg 除去された蛋白質%

(a) SCTW

(b) エスペラーゼ (1 U/mL)

+0.05%のネオドール25-7 5.6 37

(a) SCTW

(b) リポラーゼ

(0.003 U/mL) 1.6 11

(a) エスペラーゼ (1 U/mL)

+0.05%のネオドール25-7

(b) リポラーゼ

(0.003 U/mL)

+0.05%のネオドール25-7 9.8 66

(a) リポラーゼ

(0.003 U/mL)

+0.05%のネオドール25-7

(b) エスペラーゼ (1 U/mL)

+0.05%のネオドール25-7

5.2

35

エスペラーゼ／ネオドールを用いてクーポンを逐次的に処理した後リボラーゼ／ネオドールで処理することで得られる、汚染されたクーポンからの蛋白質除去は、各々の酵素単独が示す添加効果よりも良好であった。予想外に、その逆（例えば最初にリボラーゼで処理した後プロテアーゼで処理する）は有効でなかった。

【0056】実施例13

逐次的酵素処理を用いたバイオフィーム除去

この実施例は、プロテアーゼと、カルボヒドラーゼまたはリパーゼ／カルボヒドラーゼ混合物とを用いた、汚染されたクーポンに対する逐次的酵素処理の効果を示すも

のである。以下に示すデータは、独立した3つの実験の平均を表している。合成冷却タワー水中の未処理対照クーポン（SCTW、～2.5mgの蛋白質／クーポン）および処理クーポンに対するバイオフィーム（蛋白質）除去の間の差を用いて、処理効果を測定した。処理（a）当たりの全培養時間は24時間であり、一方逐次的処理培養（b）は全体で24時間であった。これらの結果を以下の表11と12に示す。

【0057】

【表11】

表11

エスペラーゼおよびカルボヒドラーゼを用いた逐次的酵素処理の効果

| 処理 ¹ | 除去された全蛋白質% |
|----------------------------|------------|
| (a) SCTW | |
| (b) エスペラーゼ (0.7 U/mL) | 36 |
| (a) SCTW | |
| (b) カルボヒドラーゼ (0.0006 U/mL) | 8 |
| (a) カルボヒドラーゼ (0.0006 U/mL) | |
| (b) エスペラーゼ (0.7 U/mL) | 40 |
| (a) エスペラーゼ (0.7 U/mL) | |
| (b) カルボヒドラーゼ (0.0006 U/mL) | 63 |

¹ バイオフィーム除去が統計学的に有意であるためには、バイオフィーム除去は>12% (0.3mg) の蛋白質除去である必要があった。クーポンを、3mg/クーポンの蛋白質負荷率で、単一の酵素/SCTW処理当

たり24時間か或は全体で48時間培養し、そしてaおよびbは、逐次的処理を表している。

【0058】

【表12】

表12

| 処理 | 除去された蛋白質mg (2) | 除去された蛋白質% (2) |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| (a) SCTW | | |
| (b) エスペラーゼ (1 U/mL) | 0.8 | 31 |
| (a) SCTW | | |
| (b) BAN 120L (0.006 U/mL) | | |
| ＋リボラーゼ | | |
| (0.003 U/mL) | 0.2 | 7 |
| (a) エスペラーゼ (1 U/mL) | | |
| (b) BAN 120L (0.006 U/mL) | | |
| ＋リボラーゼ | | |
| (0.003 U/mL) | 1.4 | 56 |
| (a) BAN 120L (0.006 U/mL) | | |
| ＋リボラーゼ | | |
| (0.003 U/mL) | | |
| (b) エスペラーゼ (1 U/mL) | 0.5 | 21 |

これらの結果は、実施例12に示すそれと一致している。即ち、付加効果よりも高い効果を得るためには、汚染された表面を最初にプロテアーゼで処理した後、酵素（類）から成る第二群で処理する必要がある。再び、その逆は予想外の結果をもたらした。

【0059】実施例14

水処理化学品とエスペラーゼとの適合性

この実施例は、次亜塩素酸塩およびスケール用および腐食化学品を含む水処理化学品の存在下におけるエスペラーゼ活性の安定性を示し、そして更に、殺生物剤の存在下でエスペラーゼが有効にバイオフィームを除去することを同様に示すものである。これらの結果を表13か

ら16に示す。他の種類の処理化学品存在下におけるエスペラーゼの効力は、この酵素が有する健全な性質に如何なる悪影響も示さないと期待される。

【0060】
【表13】

表13
エスペラーゼの安定性に対するDearborn水処理化学品の影響
残存活性(%)

| 処理(1) | 24時間後 | 48時間後 |
|---|-------|-------|
| エスペラーゼ(1U/mL) | 107 | 121 |
| +50ppmの分散剤 | 99 | 121 |
| +250ppmのDearborn A | 82 | 97 |
| +75ppmのDearborn B | 84 | 89 |
| +150ppmのDearborn C | 99 | 88 |
| +0.05%のネオドール25-7 | 103 | 100 |
| +0.05%のネオドール25-7+ 50ppmの分散剤 | 100 | 92 |
| +0.05%のネオドール25-7+ 50ppmのDearborn A | 96 | 105 |
| +0.5%のネオドール25-7+ 75ppmのDearborn B | 96 | 91 |
| +0.5%のネオドール25-7+ 150ppmのDearborn C | 114 | 113 |
| +5ppmのNaClO+ 0.05%のネオドール25-7 | 5 | 5 |
| +5ppmのNaClO+ 0.05%のネオドール25-7+ 50ppmの分散剤 | 13 | 13 |
| +5ppmのNaClO+ 0.05%のネオドール25-7+ 250ppmのDearborn A | 3 | 5 |
| +5ppmのNaClO+ 0.05%のネオドール25-7+ 75ppmのDearborn B | 3 | 3 |
| +5ppmのNaClO+ 0.05%のネオドール25-7+ 150ppmのDearborn C | 63 | 52 |

(1) 上記分散剤はアミド型の分散剤であり、そしてDearborn A、Dearborn BおよびDearborn Cは、有機の金属イオン封鎖剤と分散剤と腐食抑制剤のブレンドを含ん

でいる。この培養温度は40℃であった。
【0061】
【表14】

表14
バイオフィルム除去に対する異なる水処理化学品の効果⁽¹⁾

| 処理 | 除去された蛋白質mg ⁽²⁾ | 除去された蛋白質% |
|-------------------|---------------------------|-----------|
| 0.05%のネオドール25-7 | 0.2 | 6 |
| 150ppmのDearborn C | 0 | 0 |
| 75ppmのDearborn B | 0 | 0 |
| 250ppmのDearborn A | 0.2 | 6 |
| 50ppmの分散剤 | 0 | 0 |
| エスペラーゼ(1U/mL) | | |
| +0.05%のネオドール | 0.8 | 23 |
| エスペラーゼ(1U/mL) | | |
| +0.05%のネオドール | | |

| | | |
|---|-----|----|
| +150ppmのDearborn C エスペラーゼ(1U/mL) +0.05%のネオドール | 1.0 | 30 |
| +75ppmのDearborn B エスペラーゼ(1U/mL) +0.05%のネオドール | 0.9 | 29 |
| +250ppmのDearborn A エスペラーゼ(1U/mL) +0.05%のネオドール | 1.7 | 52 |
| +50ppmの分散剤 | 0.6 | 17 |

(1) 分散剤、Dearborn A、Dearborn BおよびDearborn Cは表13で定義したのと同じである。培養温度は40℃であった。

有意であるためには、蛋白質除去は ≥ 0.4 mgの蛋白質(12%)である必要があった。

【0063】

【0062】(2) バイオフィilm除去が統計学的に

【表15】

表15

選択したDearborn殺生物剤とエスペラーゼとの適合性

| 処理 ⁽¹⁾ | 残存活性(%) | |
|-------------------|---------|------|
| | 24時間 | 48時間 |
| 1U/mLのエスペラーゼ+ | | |
| 0.05%のネオドール25-7 | 102 | 106 |
| +250ppmの殺生物剤A | 96 | 93 |
| +100ppmの殺生物剤B | 101 | 102 |
| +100ppmの殺生物剤C | 150 | 116 |
| +120ppmの殺生物剤D | 73 | 64 |
| +150ppmの殺生物剤E | 99 | 94 |
| +200ppmの殺生物剤F | 89 | 150 |
| +12ppmの殺生物剤G | 94 | 91 |
| +125ppmの殺生物剤H | 91 | 109 |

(1) 培養温度は40℃であった。

【表16】

【0064】

表16

Dearborn殺生物剤との組み合わせにおける汚染されたクーボンに対する酵素処理の効果

| 処理 ⁽¹⁾ | 除去された蛋白質mg ⁽²⁾ | 除去された蛋白質% ⁽²⁾ |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1U/mLのエスペラーゼ | 2.3 | 33 |
| 250ppmの殺生物剤A | 0.4 | 5 |
| 120ppmの殺生物剤D | 0.8 | 11 |
| 150ppmの殺生物剤E | 0.6 | 9 |
| 1U/mLのエスペラーゼ | | |
| +250ppmの殺生物剤A | 3.0 | 43 |
| 1U/mLのエスペラーゼ | | |
| +120ppmの殺生物剤D | 2.7 | 38 |
| 1U/mLのエスペラーゼ | | |
| +150ppmの殺生物剤E | 2.5 | 36 |

(1) 表15および16に挙げる各々の殺生物剤が有する活性成分を以下に示す。全ての酵素処理は、SCTWを用いた処理を除いて、ネオドール25-7を0.05%添加することを含んでいた。

(12%の除去)である必要があった。

【0066】殺生物剤A— 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアズリン-3-オン、2-メチル-4-イソチアジン-3-オン

【0065】⁽²⁾ バイオフィilm除去が統計学的に有意であるためには、蛋白質除去は ≥ 0.8 mgの蛋白質

殺生物剤B— N-アルキル-1, 3-プロパンジアミン

殺生物剤Cー メチレンビスー（チオシアネート）
 殺生物剤Dー ジメチルジチオカルバミン酸ナトリウム、エチレンビス（ジチオカルバミン酸）二ナトリウム
 殺生物剤Eー アルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、ビス（トリ-n-ブチル錫）オキサイド
 殺生物剤Fー ポリ〔オキシエチレン（ジメチルイミノ）エチレン（ジメチルイミノ）エチレンジクロライド〕
 殺生物剤Gー 2，2-ジブロモ-3-ニトリロプロピオナミド
 殺生物剤Hー N-アルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、ビス（トリ-w-ブチル錫）オキサイド、N-アルキル1，3-プロパンジアミン

実施例15

水処理化学品とビブリオリシンおよびアルカラーゼとの適合性

この実施例は、次亜塩素酸塩およびスケール用および腐食化学薬品を含む水処理化学薬品の存在下におけるビブリオリシン活性の安定性を示し、そして更に、殺生物剤の存在下でビブリオリシンが有効にバイオフィルムを除去することを同様に示すものである。これらの結果を表17-19に示す。他の種類の処理化学薬品存在下におけるビブリオリシンの効力は、この酵素が有する健全な性質に如何なる悪影響も示さないと期待される。

【0067】種々の殺生物剤存在下におけるアルカラーゼに関する安定性のデータを表20に示す。これらの化合物の存在下におけるバイオフィルム除去に対する試験は行わなかったが、エスペラーゼとアルカラーゼとは類似していることから、匹敵する性能が期待される。

【0068】

【表17】

表17

ビブリオリシンの安定性に対するDearborn水処理化学薬品の影響^(a)

| 処理 ^(b) | 残存活性 (%) | |
|----------------------------|----------|-------|
| | 24時間後 | 48時間後 |
| なし | 68 | 64 |
| 分散液 | 69 | 64 |
| Dearborn A | 69 | 66 |
| Dearborn B | 66 | 70 |
| Dearborn C | 76 | 67 |
| ネオドール25-7 | 67 | 63 |
| ネオドール25-7+分散剤 | 77 | 71 |
| ネオドール25-7+Dearborn A | 87 | 78 |
| ネオドール25-7+Dearborn B | 82 | 68 |
| ネオドール25-7+Dearborn C | 76 | 63 |
| ネオドール25-7+NaClO | 84 | 84 |
| 分散剤+ネオドール25-7+NaClO | 82 | 75 |
| Dearborn A+ネオドール25-7+NaClO | 80 | 77 |
| ネオドール25-7+Dearborn B+NaClO | 78 | 83 |
| ネオドール25-7+Dearborn C+NaClO | 73 | 74 |

(a) 種々の水処理化学薬品が入っているSCTW中40℃でビブリオリシン（20U/mL）を培養し、サンプルを取り出した後、アゾカゼインアッセイを用いて残存活性を分析した。

【0069】(b) 水処理化学薬品の濃度は下記の通りであった。分散剤（50ppm）、Dearborn A（250

ppm）、Dearborn B（75ppm）、Dearborn C（150ppm）、ネオドール25-7（0.05%）およびNaClO（5ppm）。

【0070】

【表18】

表18

選択したDearborn殺生物剤とビブリオリシンとの適合性

| 処理 ^(c) | 残存活性 (%) | |
|--------------------|----------|------|
| | 24時間 | 48時間 |
| 実験1 ^(a) | | |
| なし | 73 | 62 |

| | | |
|--------------------|----|----|
| 殺生物剤A | 75 | 71 |
| 殺生物剤B | 72 | 68 |
| 殺生物剤C | 86 | 83 |
| 殺生物剤D | 92 | 81 |
| 殺生物剤E | 73 | 75 |
| 殺生物剤F | 72 | 71 |
| 殺生物剤G | 75 | 64 |
| 殺生物剤H | 78 | 74 |
| 実験2 ^(b) | | |
| なし | 77 | 69 |
| 殺生物剤A | 70 | 64 |
| 殺生物剤B | 69 | 66 |
| 殺生物剤C | 81 | 78 |
| 殺生物剤D | 79 | 70 |
| 殺生物剤E | 80 | 80 |
| 殺生物剤F | 81 | 70 |
| 殺生物剤G | 77 | 71 |
| 殺生物剤H | 79 | 73 |

(a) 殺生物剤の有り無しで、0.05%のネオドール25-7が入っているSCTW中40℃でビブリオリシン(1U/mL)を培養した。

【0071】^(b) 殺生物剤の有り無しで、0.05%のネオドール25-7と5ppmのNaClOが入っているSCTW中でビブリオリシン(20U/mL)を培養した。

【0072】^(c) 殺生物剤の濃度は下記の通りであった。A(250ppm)、B(100ppm)、C(100ppm)、D(120ppm)、E(150ppm)、F(200ppm)、G(12ppm)およびH(125ppm)。

【0073】

【表19】

表19

ビブリオリシンの効力に対するDearborn水処理化学品の影響^(a)

| 実験 | 処理 | 乾燥重量 (クーポン当たりの 平均mg) | 除去された蛋白質% |
|------------------|-------------|----------------------------|-----------|
| 1 ^(b) | 酵素なし | 7.83 | — |
| | 殺生物剤A | 5.67 | 27.6 |
| | 殺生物剤D | 5.18 | 33.8 |
| | 殺生物剤E | 5.52 | 29.5 |
| | ネオドール | 5.30 | 32.5 |
| | ネオドール+殺生物剤A | 5.14 | 34.4 |
| | ネオドール+殺生物剤D | 4.46 | 43.0 |
| | ネオドール+殺生物剤E | 4.96 | 36.7 |
| 2 ^(c) | 酵素なし | 6.65 | — |
| | 殺生物剤A | 4.54 | 30.7 |
| | 殺生物剤D | 4.20 | 35.9 |
| | 殺生物剤E | 4.79 | 26.9 |
| | ネオドール | 3.76 | 42.6 |
| | ネオドール+殺生物剤A | 3.78 | 42.3 |
| | ネオドール+殺生物剤D | 3.54 | 46.0 |
| | ネオドール+殺生物剤E | 3.87 | 40.9 |

(a) SCTW中の汚染されたクーポンにビブリオリシン(1U/mL)を添加し、そして水処理化学剤有り無しにおけるバイオフィルム除去の評価を行った。殺生物剤とネオドールの濃度は表18に記述した濃度であつた。

【0074】^(b) バイオフィルム除去が統計学的に有意であるためには、蛋白質除去は ≥ 0.9 mgまたは11.5%の除去である必要があつた。

【0075】^(c) バイオフィーム除去が統計学的に有意であるためには、蛋白質除去は $\geq 0.48\text{mg}$ または7.3%の除去である必要があった。

【0076】
【表20】

表20
アルカラーゼの安定性に対する水処理化学品の影響^(a)

| 処理 ^(b) | 残存活性(%) | |
|-------------------|---------|------|
| | 30時間 | 48時間 |
| なし | 74 | 51 |
| 殺生物剤A | 77 | 57 |
| 殺生物剤D | 75 | 56 |
| 殺生物剤E | 77 | 62 |
| 殺生物剤G | 69 | 56 |

(a) 殺生物剤の有り無しで0.05%のネオドール25-7が入っているSCTW中40℃でアルカラーゼ(20U/mL)を培養し、サンプルを取り出した後、標準的アゾカゼインアッセイを用いて残存活性を分析し

た。

【0077】(b) 殺生物剤の濃度は表18に記述したのと同じであった。

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---|------|--------|---|--------|
| C 1 2 R 1:20) | | | | |
| (C 1 2 N 9/52 | | | | |
| C 1 2 R 1:185) | | | | |
| (C 1 2 N 9/52 | | | | |
| C 1 2 R 1:07) | | | | |
| (72)発明者 ドナルド・リチャード・ダーハム アメリカ合衆国メリーランド州20760ゲイ ザーバーグ・ビーバーリツジロード20617 | | | (72)発明者 ロウエナ・リザ・ロバーツ アメリカ合衆国メリーランド州20855ダー ウツド・デュウウツドドライブ7624 (72)発明者 ライドウイエン・グレイス・フアン アメリカ合衆国イリノイ州60047レイクチ ユーリヒ・パークレイロード1165 | |